



IBMC

**INSTITUTO DE BIOLOGIA
MOLECULAR E CELULAR**

Doutoramento e Pós-doutoramento
IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular
Universidade do Porto

Contents

IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular	2
Condições gerais de acolhimento	2
Unidade temática de <i>Infeção e Imunidade</i>	3
Parasitologia Molecular	3
Fish Immunology and Vaccinology (FIV)	5
Doenças Parasitárias	7
Unidade temática de <i>Biologia Molecular e Celular</i>	9
Evolução Molecular	9
Evolução de Sistemas Biológicos	10
Structural biochemistry	12
Regulação Genética /Gene Regulation	14
MicroBioSyn - Bioengineering and Synthetic Microbiology	16
Produtos naturais bioativos.....	18
Biogénese e Função de Organelos	20
Estrutura Biomolecular.....	21
Unidade temática de <i>Neurociências</i>	22
Genética da Disfunção Cognitiva	22
Ciências de Animais de Laboratório.....	23
Ageing and Stress	25

IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular

O instituto de investigação IBMC é um projecto transversal que visa promover as aptidões nos domínios das Ciências da Vida e Biomedicina. Surge sediado no Porto em 97 refletindo o esforço de conglobar entidades fragmentadas, potenciando novas competências e resulta numa evolução natural de estruturas anteriores. Possui, actualmente, 39 equipas multidisciplinares distribuídas por três unidades temáticas de investigação: Neurociências, Infecção e imunidade; Biologia Molecular e Celular. Tem um universo de cerca de 500 colaboradores e conta com 200 doutorados. A estrutura funcional é mantida por 18 serviços científicos e departamentos de suporte ou administrativos. Em 2000, o IBMC em parceria com o INEB constituíram um dos primeiros Laboratórios Associados, resultando numa das maiores estruturas de Investigação em Portugal. A actividade científica é reconhecida internacionalmente, atestada pelas inúmeras publicações acumuladas durante os últimos anos. O IBMC desenvolve outras actividades de interesse público e promotoras do desenvolvimento, tais como: o esclarecimento público, a promoção da cultura científica, a salvaguarda ética, a colaboração com o Estado na definição de políticas científico-tecnológicas, assim como a prestação de diversos serviços à comunidade. Destacamos: a preparação de futuras gerações com acções no meio escolar; a transferência de tecnologia e parcerias em projectos com a indústria nas áreas de diagnóstico e prevenção; a prestação de serviços de genética preditiva e preventiva; a realização de eventos científicos abertos; e o apoio à formação pós-graduada, quer em workshops, quer em programas de doutoramento. O IBMC tem neste momento dois programas de doutoramento, o Programa de Doutoramento em Biologia Molecular e Celular (PDBMC) e o Programa Doutoral em Biologia Básica e Aplicada (GABBA). [www.ibmc.up.pt]. Cerca de 125 estudantes de doutoramento e 80 pós-docs realizam presentemente os seus projetos de investigação no IBMC.

Condições gerais de acolhimento

Os bolseiros de doutoramento e pós-doutoramento que se juntam ao IBMC através de programas de intercâmbio e outros programas de financiamento terão a oportunidade de trabalhar num ambiente de investigação científica competitivo ao nível internacional, quer ao nível de grupo, quer do ambiente de excelência do IBMC (<http://www.ibmc.up.pt/>). Serão encorajados a participar em actividades dentro do instituto, bem como em eventos internacionais da sua área científica.

Espera-se que os estudantes tenham a sua subsistência assegurada através de Bolsas de Doutoramento ou pós-doutoramento, e no caso de existir propinas (tuition and bench fees) associadas aos estudos de doutoramento, estas possam ser disponibilizadas para cobrir custos do trabalho laboratorial.

Cada grupo de investigação reserve o direito de seleccionar estudantes com base em entrevistas, referências e quando aplicável períodos à experiência de 1-2 meses no laboratório.

Unidade temática de Infecção e Imunidade

Parasitologia Molecular

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/molecular-parasitology>

Contacto: Ana Tomás (atomas@ibmc.up.pt)

O grupo de Parasitologia Molecular (Molecular Parasitology ou MP) trabalha sobretudo com o protozoário *Leishmania*, o agente das leishmanioses (doenças do homem e do cão), e estuda aspectos fundamentais da biologia e bioquímica destes organismos passíveis de serem inactivados por fármacos e da sua interacção com os hospedeiros. O grupo tem presentemente duas linhas principais de investigação a decorrer. A primeira, em que trabalha há vários anos, relaciona-se com a elucidação dos mecanismos de resistência ao stress oxidativo e com outros processos relacionados com o metabolismo dos tióis (Castro *et al.*, *PLoS One*, 2010; Castro *et al.*, *PLoS Pathogens*, 2011; Tomás & Castro, *Antioxid Redox Signal*, *in press*). A segunda linha de trabalho investiga a aquisição de metais e a influência que estes têm no desenvolvimento do parasita.

O grupo é dirigido por Ana Tomás uma parasitologista molecular (MSc e PhD, Universidade de Londres) e professora associada de parasitologia na Universidade do Porto e é constituído por uma Investigadora Senior, 3 post-docs, 1 estudante de doutoramento e 1 de mestrado e, ainda, 3 bolseiros de investigação.

Temas para projectos de Doutoramento

“Metabolismo redox mitocondrial em *Leishmania*”

As mitocôndrias de *Leishmania* são um local onde se produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS). Há vários aspectos que terão que ser investigados nesta área. Queremos saber i) onde se produzem os ROS, ii) elucidar melhor o processo que permite a sua eliminação e iii) perceber se são apenas by-produtos do metabolismo aeróbico do parasita ou, como acontece noutros organismos, são moléculas fundamentais em processos de sinalização essenciais para o parasita e para a infecção.

“Sensing” de metais em *Leishmania*

Em trabalho anterior identificámos o primeiro transportador de zinco em *Leishmania* (ZIP3, Carvalho *et al.*, manuscrito em preparação). Esta proteína encontra-se na membrana celular do parasita quando a concentração de zinco no meio é baixa mas não quando este metal está em excesso. Dado o papel fundamental desempenhado pelo zinco ao longo do ciclo de vida da *Leishmania*, queremos saber como é que o parasita “sente” a falta ou o excesso de zinco. Para isso será estudada a forma como a proteína ZIP3 é regulada pelo zinco e verificado se o mecanismo subjacente é comum a outras proteínas moduladas por este metal. Estudar-se-á também se o processo em causa é passível de ser inactivado por fármacos.

Publicações recentes:

1. Tomás AM, Castro H (2012). Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal. In press*
2. Vale-Costa S, Gomes-Pereira S, Teixeira CM, Rosa G, Rodrigues PN, Tomás A, Appelberg R, Gomes MS (2013). Iron Overload Favors the Elimination of *Leishmania infantum* From Mouse Tissues Through Interaction With Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *PLoS Negl Trop Dis*, 7:e2061
3. Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, Flórido M, Appelberg R, Oliveira P, Ferreira da-Silva F, Tomás AM. (2011). *Leishmania* mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection. Insight into its novel chaperone activity. *PLoS Pathogens*. 7:e1002325.
4. Castro H, Romao S, Carvalho S, Teixeira F, Sousa C, Tomás AM. (2010). Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity. *PLoS One*, 5:e12607.
5. Carvalho, S, Cruz, T, Santarém, N, Castro, H, Costa, V, Tomás, AM. (2009). Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Tropica*, 109:131-105

Fish Immunology and Vaccinology (FIV)

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/fish-immunology-and-vaccinology>

Contacto: Nuno Santos (nsantos@ibmc.up.pt)

O grupo de Imunologia e Vacinologia de Peixes (FIV) dedica-se ao estudo da interação entre agentes patogénicos e os respetivos hospedeiros tendo como base organismos aquáticos, nomeadamente peixes e seus agentes infecciosos.

Os peixes são o primeiro grupo filogenético onde o sistema imune adaptativo está totalmente desenvolvido, de forma semelhante ao dos mamíferos, representando por isso um elo de ligação único para o estudo do sistema imune. Por outro lado, o ambiente aquático, onde a transmissão de agentes infecciosos está facilitada, permite a ocorrência de uma enorme diversidade de agentes patogénicos cujas estratégias e mecanismos de infeção têm representatividade ao longo de toda a escala filogenética, inclusivamente em humanos. Deste modo, o conhecimento gerado contribuirá não só para o conhecimento geral em biologia molecular e celular, mas também para o desenvolvimento de tecnologias e a sua aplicação quer a organismos aquáticos, como no caso da indústria aquícola, quer à biotecnologia, farmacologia e biomedicina.

Neste contexto, o grupo tem estado a estudar um mecanismo de patogenicidade da bactéria *Photobacterium damsela piscicida* (*Phdp*) que assenta na secreção de uma toxina tipo AB [1], denominada AIP56 (Apoptosis Inducing Toxin of 56 kDa), que cliva o NF- κ B e leva à morte por apoptose de macrófagos e neutrófilos [2-6].

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Presentemente e a médio-longo prazo, o grupo está interessado em aprofundar o estudo da relação da estrutura da toxina com a sua função, nomeadamente a definição detalhada de subdomínios, porções e/ou aminoácidos importantes para determinada função, incluindo a resolução da estrutura tridimensional da toxina, isolada ou em complexo com o seu recetor ou alvo celular. A interação da toxina com as células e o seu tráfico intracelular são igualmente aspetos que estamos a aprofundar. Finamente, o facto do alvo celular ser o NF- κ B, serve igualmente de estímulo para estudar a aplicação da AIP56 com vista à sua utilização biotecnológica, farmacêutica e biomédica, nomeadamente em situações associadas com a ativação descontrolada do NF- κ B, tais como em doenças inflamatórias ou cancro. Os trabalhos descritos serão efetuados em colaboração com outros grupos, quer residentes quer externos a nível internacional.

Quaisquer das linhas de investigação mencionadas resultarão no desenvolvimento de trabalhos com elevado impacto no domínio científico e tecnológico, permitindo a alunos de doutoramento

o pós-doutoramento desenvolver técnicas e adquirir conhecimentos que permitirão desenvolver e/ou aprofundar a sua carreira científica.

- [1] Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. *Toxins* 2010;2(7):1612-45.
- [2] do Vale A, Costa-Ramos C, Silva A, Silva DS, Gartner F, dos Santos NM, et al. Systemic macrophage and neutrophil destruction by secondary necrosis induced by a bacterial exotoxin in a Gram-negative septicemia. *Cell Microbiol* 2007 Apr;9(4):988-1003.
- [3] do Vale A, Costa-Ramos C, Silva DS, Macedo PM, Fernandes R, Sampaio P, et al. Cytochemical and ultrastructural study of anoikis and secondary necrosis in enterocytes detached in vivo. *Apoptosis* 2007 Jun;16(6):1069-83.
- [4] do Vale A, Silva MT, dos Santos NMS, Nascimento DS, Reis-Rodrigues P, Costa-Ramos C, et al. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology* 2005;58(4):1025-38.
- [5] Silva DS, Pereira LMG, Moreira AR, Ferreira-da-Silva F, Brito RM, Faria TQ, et al. The Apoptogenic Toxin AIP56 Is a Metalloprotease A-B Toxin that Cleaves NF- κ B p65. *PLoS Pathog* 2013;9(2):e1003128.
- [6] Silva MT, dos Santos NMS, do Vale A. AIP56: A Novel Bacterial Apoptogenic Toxin. *Toxins* 2010;2(4):905-18.

Doenças Parasitárias

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/parasite-disease>

Contacto: Anabela Cordeiro-de-Silva (cordeiro@ibmc.up.pt)

O foco da pesquisa do grupo de Doenças Parasitárias é o estudo de protozoários tripanosomatídeos, organismos responsáveis pelas doenças humanas e veterinárias, tais como a leishmaniose, a tripanossomíase Africano e a Doença de Chagas. O controlo da doença está dependente da quimioterapia que é limitada e altamente tóxica, uma vez que não está disponível uma vacina humana. Um dos principais interesses do grupo é a compreensão dos mecanismos imunitários do hospedeiro envolvidos no controlo / suscetibilidade à infecção por tripanosomatídeos.

Várias alterações da resposta imune após a infecção foram descritas, tais como imunossupressão e ativação de células B policlonais, incluindo a expansão de clones auto-reativos. O parasita, com o objetivo de resistir ao sistema imunitário, produz ativadores policlonais com atividade imunossupressora. Além disso, o controlo de células hospedeiras na interação hospedeiro-patogénio realiza-se através das proteínas de superfície e secretadas pelo parasita.

O primeiro objetivo do nosso estudo é identificar e caracterizar estas moléculas associadas com a sobrevivência do parasita. O desenvolvimento de novos fármacos anti-*Leishmania* é uma das áreas urgente, uma vez que o tratamento de base para controlar a infeção por tripanosomatídeos causa graves efeitos secundários nos pacientes, pelo que as falhas do tratamento são problemas comuns em muitas áreas onde a doença é endémica. O segundo objetivo do nosso grupo é a caracterização de novos compostos com atividade anti-tripanosomatídea. Dentro desta área de interesse pretendemos identificar e validar novos alvos terapêuticos e sistemas de distribuição de fármacos com base em nanoformulações. Em particular, temos vindo a desenvolver o encapsulamento fármacos anti-*Leishmania* em nanopartículas poliméricas de PLGA para resolver várias limitações dos sistemas convencionais de entrega de fármacos.

O grupo também está interessado na melhoria de ferramentas de diagnóstico da leishmaniose. Demonstramos uma estratégia de combinação de dois antigénios bem definidos de *Leishmania*, rK39 e LicTXNPx, o que provou ser uma melhoria na sensibilidade e especificidade do diagnóstico serológico na leishmaniose canina.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Papel imunorregulador de vesículas excretadas / secretados de *Leishmania*: foco na interação com células do hospedeiro.

Estudo de novos fármacos específicos para controlar infeções causadas por Tripanosomatídeos.

Desenvolvimento de um novo método imunológico de rastreio da leishmaniose pelo uso da tecnologia "Lab-on-Paper"

Unidade temática de Biologia Molecular e Celular

Evolução Molecular

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/molecular-evolution>

<http://evolution.ibmc.up.pt/>

Contacto: Jorge Vieira (jbvieira@ibmc.up.pt).

O grupo de Evolução Molecular tem como objectivo identificar a base genética da variação fenotípica dentro e entre espécies. Esta é uma das grandes questões da Biologia do século XXI. Como sistema modelo utilizamos *Drosophila*. As características fenotípicas que temos vindo a estudar são: longevidade, tempo de desenvolvimento, resistência ao frio e propensão para entrar em diapausa. Para tal usamos uma grande variedade de abordagens, incluindo a genómica e a transcriptómica. Na interpretação dos resultados usamos conceitos de evolução molecular e de genética populacional. Um projecto tipo é aqui apresentado, embora sendo esta uma área em rápida evolução, o projecto específico a desenvolver será sempre discutido com o aluno na altura da sua integração no laboratório.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Projeto tipo: O gene *methuselah* de *Drosophila melanogaster*

O gene *methuselah* (*mth*; uma "G-coupled protein"), foi recentemente descrito como um novo gene que tem menos do que 10 milhões de anos. No entanto, tem um padrão de expressão altamente específico em embriões, larvas e adultos, e foi implicado no desenvolvimento larvar, resistência ao stress e longevidade, entre outros. Embora o gene *mth* pertença a uma sub-família de genes com 16 membros, em *D. melanogaster*, não há nenhuma evidência para redundância funcional. Como tal, é surpreendente que um gene que influencia tantas características seja um gene de origem recente. Por isso, exploramos a hipótese alternativa de que o gene *mth* é um gene antigo, usando uma abordagem filogenética, dados de sintenia, e análises de estrutura de proteínas, entre outros. Genes identificados como possíveis ortólogos do gene *mth* em espécies distantemente relacionadas com *D. melanogaster*, são utilizados em estudos de associação genótipo-fenótipo com o intuito de identificar variantes que estejam associados com o tempo de desenvolvimento e tempo de vida.

Evolução de Sistemas Biológicos

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/evolutionary-systems-biology>

Contacto: Cristina Vieira (cgvieira@ibmc.up.pt).

O grupo de Evolução de Sistemas Biológicos estuda co-evolução a nível molecular. Usa como modelo o sistema de auto-incompatibilidade gametofítica presente na maioria das angiospermas. Neste sistema, a especificidade da reação depende de um componente feminino e de componentes do pólen. Estes têm de co-evoluir para evitar a auto-fecundação ou fertilização por indivíduos geneticamente relacionados. O trabalho realizado por nós passa pela caracterização molecular dos componentes da reação em diversas espécies. O componente feminino nas diferentes espécies é uma ribonuclease extracelular, e a do pólen, que pode ser determinado por um só gene (como em espécies do género *Prunus*) ou múltiplos genes (como em *Pyrinae* e espécies de *Solanaceae*) com domínio F-box. Neste sistema os genes estão sobre seleção balancadora. Na interpretação dos resultados usamos conceitos de evolução molecular e de genética populacional. Um projecto tipo é aqui apresentado, embora sendo esta uma área em rápida evolução, o projecto específico a desenvolver será sempre discutido com o aluno na altura da sua integração no laboratório.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Projeto tipo: Co-Evolução dos genes *S-RNase* e *SFB* em *Pyrinae*

O mecanismo bioquímico que determina a inibição da atividade do componente feminino da auto-incompatibilidade gametofítica (uma ribonuclease extracelular, denominada S-RNase) por parte do pólen, é distinto em *Prunus* (*Rosaceae*) e *Pyrinae* (*Rosaceae*) - *Solanaceae*. Em *Prunus*, a S-RNase é inativada devido à ligação a um inibidor geral. Na presença de proteínas masculinas do mesmo haplótipo (denominadas self) a S-RNase liberta-se do inibidor geral, liga-se ao gene do pólen, fica ativa, e degrada o RNA do tubo polínico. Em *Pyrinae* (*Malus* e *Pyrus*) e em espécies da família das *Solanaceae*, o componente do pólen interage fortemente com não self -RNases, mediando assim a degradação destas, pela via da ubiquitina. A presença de múltiplos genes com motivo F (envolvidos na degradação pela via da ubiquitina), com expressão restrita no pólen, e baixos níveis de diversidade, que estão localizados na proximidade do gene S-RNase em *Pyrinae* e *Solanaceae*, levantou a hipótese de que múltiplos genes do pólen (chamados SFBBs em *Pyrinae*) são necessários para o reconhecimento do grande número de non-self S-RNases. Em *Petunia* (*Solanaceae*) experiências usando plantas transgénicas com três desses genes, mostraram que estes afetam o fenótipo SI. Em *Pyrinae*, o alelo truncado de um gene SFBB, também afeta o fenótipo SI. A identificação de mutações adicionais dos genes SFBB, requer a caracterização destes genes em diversos S-haplótipos (o fenótipo SI será diferente apenas na presença da S-RNase que é reconhecida pelo gene mutado). O número de genes SFBB na região S-locus é desconhecida. Só depois de conhecer os genes que determinam a especificidade deste sistema, podemos entender como a evolução

conjunta (co-evolução) acontece entre os genes SFBBs e o gene S-RNase. Neste trabalho iremos abordar três questões: quantos genes SFBB existem numa determinada espécie de Pyrinae, quantos estão envolvidos na determinação da especificidade do pólen, e identificar regiões de reconhecimento de especificidade destes genes.

Structural biochemistry

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/structural-biochemistry>

Contacto: João Morais Cabral (jcabral@ibmc.up.pt)

O grupo estuda os mecanismos moleculares de proteínas de membrana, canais e transportadores, que facilitam a passagem de iões através de membranas celulares. Estamos particularmente interessados nos mecanismos de transporte de iões e nos mecanismos que regulam a actividade destas proteínas. Para isso fazemos uso de técnicas diversas entre as quais, cristalografia de proteínas, electrofisiologia, fluorescência, bioquímica e biologia molecular. Temos vários projectos a decorrer, de que se destacam o estudo do transportador bacteriano de iões de potássio KtrAB (1,2) e um projecto focado num canal de iões de potássio (3,4), também de bactéria.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Estamos interessados em acolher pós-doutorados com experiência em purificação e caracterização de proteínas e/ou cristalografia de proteínas (será providenciado treino adequado em técnicas com as quais o pós-doutorado é menos familiar). O projecto incidirá na determinação da estrutura de um canal de potássio KCNH presente em organismos eucariotas. Esta família de canais está envolvida em diversos processos fisiológicos e é particularmente conhecida por estar relacionada com o síndrome de LQT2 em humanos, que se caracteriza por arritmias cardíacas e morte súbita. Estes canais têm grandes regiões citoplasmáticas que parecem funcionar como plataformas de interface entre o estado de activação do canal e redes de sinalização celulares. Ao longo dos anos temos caracterizado várias dessas regiões (5,6,7) do canal e agora pretendemos avançar para a caracterização do canal inteiro.

O grupo é formado por vários pós-doutorados e por estudantes de doutoramento que conferem um ambiente diverso e acolhedor a investigadores com conhecimentos diversos. O grupo tem financiamento regular de agências portuguesas (FCT) e internacionais (EMBO e NIH).

1- Vieira-Pires RS, Szollosi A, Morais-Cabral JH "The structure of the KtrAB potassium transporter" **Nature** (2013) in press

2- Albright RA, Vazquez Ibar JL, Kim CU, Gruner SM, Morais-Cabral JH "The RCK domain of the KtrAB K⁺ transporter: multiple conformations of an octameric ring." **Cell** (2006), 126: 1147-59

3- Clayton G., Silverman W., Heginbotham L., Morais-Cabral J.H. "Structural basis of activation of a bacterial cyclic nucleotide regulated potassium channel" **Cell** (2004), 119:615-27.

4- Clayton GM, Altieri S, Heginbotham L, Unger VM, Morais-Cabral JH "Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel." **Proc Natl Acad Sci U S A.** (2008), 105:1511-5.

- 5- Harley CA, Jesus CS, Carvalho R, Brito RM, Morais-Cabral JH. "Changes in Channel Trafficking and Protein Stability Caused by LQT2 Mutations in the PAS Domain of the HERG Channel." **PLoS One** (2012), 7(3):e32654.
- 6- Marques-Carvalho MJ, Sahoo N, Muskett FW, Vieira-Pires RS, Gabant G, Cadene M, Schönherr R, Morais-Cabral JH. "Structural, biochemical and functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel." **J Mol Biol.** (2012), 423:34-46.
- 7- Adaixo R, Harley CA, Castro-Rodrigues AF, Morais-Cabral JH. "Structural properties of PAS domains from the KCNH potassium channels" **PLoS One.** 2013;8(3):e59265.

Regulação Genética / Gene Regulation

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/gene-regulation>

Contacto: Alexandra Moureira alexandra.moreira@ibmc.up.pt

O objetivo principal do Grupo Regulação Genética é compreender e elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão genética ao nível do processamento do pré-mRNA, em particular na formação do terminal 3', em Eucariotas superiores. Utilizamos maioritariamente metodologias de biologia molecular, em particular técnicas de RNA, e diferentes modelos de estudo, nomeadamente linfócitos T e linhas celulares humanas, e *Drosophila melanogaster*.

As interacções dinâmicas que ocorrem entre variados factores e a RNA polimerase II (PolII) promovem a iniciação, alongação e terminação da transcrição, assim como o processamento do pre-mRNA - 5' capping, splicing e clivagem/poliadenilação da extremidade 3'. A terminação da transcrição pela PolII é um processo que está intimamente relacionado com a poliadenilação, com o reconhecimento do sinal de poliadenilação (pA). A poliadenilação alternativa (APA) na região 3' não traduzida (3'UTR) é um mecanismo essencial na regulação da expressão genética, controlado em parte pela cinética da transcrição, como demonstramos recentemente. Demonstrámos também, pela primeira vez em um organismo vivo, quais as consequências fisiológicas da incorrecta selecção do sinal pA: moscas transgénicas que não têm o sinal pA distal do gene *polo* morrem, devido a uma falha na proliferação celular.

No entanto, as questões fundamentais que permanecem sem resposta e que queremos elucidar é como é que a célula escolhe um sinal pA em vez de outro, como é regulada essa selecção e como é que a APA modula a expressão genética.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Os projectos de doutoramento e pós-doutoramento que propomos desenvolver estão enquadrado em projectos mais globais financiados pela FCT e são:

1) A resposta imune, após a activação inicial das células imunológicas, tem que ser controlada com precisão a fim de evitar o desenvolvimento de doenças hiper-proliferativas e de auto-imunidade. Após activação das células T, ocorre uma mudança global na selecção do sinal pA originando 3'UTRs mais curtos e com menos locais de silenciamento por miRNAs. Iremos centrar-nos na analisar genes/mRNAs especificamente envolvidos na interrupção da resposta imune em células T humanas, que codificam para inibidores/moduladores das cascatas de sinalização e que estejam sujeitos a APA no 3'UTR (por exemplo, CTLA-4, CD5, PTEN). Usando uma biblioteca de lentivirus para depleção de mRNAs via shRNA iremos identificar os factores envolvidos na APA em linhas de células T humanas. As proteínas e sequências de RNA reguladoras da APA, assim como miRNAs, serão identificadas por métodos de biologia molecular e celular (3'RACE, RT-qPCR, Northern, Western, FACS, UV crosslinking e imunoprecipitações, genes reporter, mini-genes).

2) A arquitectura do promotor e a presença de elementos-cis foram descritos como moduladores da cinética da PolII. A função da cinética da PolII em APA foi anteriormente estudada no caso do *polo*. Agora vamos investigar o efeito da cinética de transcrição da PolII na selecção dos sinais pA alternativos a nível global, por RNA-Seq. Os mecanismos moleculares envolvidos na crosstalk entre a transcrição e APA serão investigados por ChIP, RNAi, RT-qPCR.

Referências:

Lutz CS, Moreira A (2011) Wiley Interdisciplinary Reviews – RNA, 2: 23-31

Pinto, PAB, Henriques, H, Freitas, MO, Martins, T, Domingues, RG, Wyrzykowska, PS, Coelho, PA, Carmo, AM, Sunkel, CE, Proudfoot, NJ and Moreira, A (2011) EMBO J, 30: 2431–2444

Moreira, A (2011) Nucleus 2: 556 - 561.

Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. (2008) Science. 320:1643-7

MicroBioSyn - Bioengineering and Synthetic Microbiology

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/bioengineering-and-synthetic-microbiology>

Contacto: Paula Tamagnini (pmtamagn@ibmc.up.pt)

Ao longo dos anos, o grupo MicroBioSyn tem-se dedicado a explorar o potencial fisiológico e metabólico das cianobactérias para desenvolver múltiplas aplicações biotecnológicas. A produção sustentável de biocombustíveis, o desenvolvimento de soluções de bioremediação, a criação de membranas com aplicabilidade no tratamento de águas, a procura de compostos bioactivos, constituem alguns dos pontos de maior interesse e de maior investimento científico. Para alcançar os objectivos propostos, o grupo tem desenvolvido variadas técnicas no âmbito da fisiologia e biologia molecular de cianobactérias, sendo de destacar o *expertise* em biologia sintética. No decorrer de diferentes projetos, o grupo MicroBioSyn tem estabelecido uma plataforma de colaborações nacionais e internacionais fortes e produtivas. Segue-se uma descrição sumária das diferentes linhas de investigação em curso.

As hidrogenases de cianobactérias e o metabolismo de hidrogénio têm merecido um forte esforço científico por parte do grupo, nomeadamente a nível do estudo da transcrição e expressão de genes relacionados com estas enzimas, assim como do envolvimento de diferentes fatores de transcrição na sua regulação. Recentemente, utilizando uma abordagem de biologia sintética, a cianobactéria unicelular *Synechocystis* PCC 6803 foi escolhida como chassis fotoautotrófico para acomodar partes e/ou módulos padronizados, projetados para suportar a produção de hidrogénio. Tendo como objetivo a introdução de uma hidrogenase heteróloga no chassis selecionado, os genes que codificam a hidrogenase bidirecional nativa foram removidos. Para além disso, locais neutros destinados à integração das partes e/ou módulos sintéticos foram identificados no genoma de *Synechocystis* através de uma análise *in silico*. De forma a obter um ambiente intracelular microaeróbio necessário à atividade da hidrogenase, foram também concebidos e sintetizados módulos sintéticos destinados ao consumo de oxigénio intracelular.

Paralelamente, o grupo está a explorar o uso de substâncias poliméricas extracelulares (EPS – *extracellular polymeric substances*) produzidas por cianobactérias para a bioremediação de metais pesados de águas poluídas. Para isso, a capacidade de várias estirpes produtoras de EPS e/ou dos seus polímeros isolados na remoção de iões metálicos foi testada, os polímeros produzidos foram caracterizados, e os grupos funcionais envolvidos na remoção dos metais foram identificados.

Em colaboração com o CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental) a diversidade de estirpes de cianobactérias isoladas de zonas intertidais ao longo da costa portuguesa foi descrita, revelando ainda que cerca de um terço dos isolados são potenciais fixadores de azoto.

No futuro, o grupo irá continuar a investigar a biossíntese/maturação das hidrogenases de cianobactérias, a caracterização de módulos sintéticos destinados a diferentes funções; as proteínas envolvidas nos últimos passos da produção de EPS irão ser caracterizados e o processo de remoção dos metais investigado, e finalmente as estirpes isoladas da costa portuguesa serão avaliadas pela sua capacidade de produção de compostos bioactivos (antibióticos, anti-tumorais).

Projectos:

FP7-ENERGY-2012-1; Contrato 308518; "CyanoFactory - Design, construction and demonstration of solar biofuel production using novel (photo)synthetic cell factories" (1/12/2012 – 30/11/2015) .

PTDC/BIA-MIC/2889/2012; "Cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS): synthesis, export and interactions with metal cations" (1/5/2013-30/4/2015)

Produtos naturais bioativos

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/bioactive-natural-products>

Contacto: Mariana Sottomayor (msottoma@ibmc.up.pt)

O principal interesse de investigação do BioNatPro é a biossíntese, transporte transmembranar e regulação dos alcalóides anticancerígenos da planta medicinal *Cataranthus roseus*, com o objetivo de implementar estratégias de manipulação genética para aumentar os níveis dos alcalóides *in planta*. *C. roseus* acumula em níveis muito baixos os alcalóides indólicos terpenóides (AITs) vinblastina e vincristina, utilizados na quimioterapia do cancro. Devido à grande importância farmacológica de seus AITs, *C. roseus* tornou-se uma das plantas medicinais mais estudadas. No entanto, embora se saiba muito sobre a biossíntese e regulação dos AITs, ainda falta a caracterização dos genes/enzimas para muitos passos biossintéticos, os mecanismos de transporte transmembranar dos AITs são basicamente desconhecidos, apesar da sua importância para a acumulação dos AITs, e nenhum regulador geral eficaz da via dos AITs foi identificado até à data. Nas folhas da planta, os AITs são acumulados em células diferenciadas do mesófilo, os idioblastos, caracterizados por uma florescência azul conspícua. No BioNatPro, efetuámos o isolamento dos idioblastos por "Fluorescence Activation Cell Sorting" dos protoplastos de folha, seguido de análise transcriptómica diferencial destas células a fim de descobrir novos genes candidatos envolvidos na biossíntese, regulação e transporte dos AITs. O proteoma do vacúolo das células de folha, onde os AITs são acumulados, foi também caracterizado. Estas abordagens ómicas permitiram a identificação de uma série de genes candidatos muito interessantes, e o grupo BioNatPro está neste momento a investigar i) vários transportadores MATE e ABC putativamente envolvidos no transporte transmembranar de AITs, ii) diversos fatores de transcrição putativamente envolvidos na regulação dos passos tardios, limitantes, da biossíntese dos AITs anticancerígenos e iii) várias enzimas que podem ser responsáveis por passos biossintético dos AITs que ainda não se encontram caracterizados.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

- i) **Clonagem e caracterização de transportadores MATE ou ABC implicados no transporte transmembranar dos alcalóides anticancerígenos da planta medicinal *Cataranthus roseus*.** Tarefas: isolamento e clonagem do gene, níveis de expressão por qPCR, geração de fusões de proteínas fluorescentes para localização subcelular, expressão em levedura e caracterização das funções das proteínas recombinantes.
- ii) **Clonagem e caracterização de fatores de transcrição implicados na regulação da via de biossíntese dos alcalóides anticancerígenos da planta medicinal *Cataranthus roseus*.** Tarefas: isolamento e clonagem do gene, níveis de expressão por qPCR, geração de fusões de proteínas fluorescentes para localização subcelular, sobreexpressão em raízes

transgénicas para a caracterização do seu impacto nos níveis de AITs, silenciamento por VIFS (vírus induced gene silencing) em plantas, para investigar as alterações no fenótipo dos AITs.

Biogénese e Função de Organelos

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/organelle-biogenesis-and-function>

Contacto: Jorge Azevedo (jazevedo@ibmc.up.pt)

Equipa: Jorge E. Azevedo (PI); Andreia F. Carvalho (Pós-Doc); Manuel P. Pinto (Pós-Doc); Cláudia P. Grou (Pós-Doc); Tânia Francisco (PhD student); Tony A. Rodrigues (PhD student)

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

1- A linha de investigação principal deste grupo tem como objetivo compreender os mecanismos moleculares do "sorting" proteico para os peroxissomas de mamíferos. Pretende-se identificar e caracterizar os componentes da maquinaria envolvida e definir o mecanismo da translocação proteica através da membrana do organelo. A investigação realizada assenta fortemente em abordagens bioquímicas, que vão desde a purificação de proteínas ao desenvolvimento de sistemas de importação in vitro.

2- A segunda linha de investigação, iniciada mais recente, visa compreender a maquinaria envolvida nas modificações transientes com ubiquitina e moléculas relacionadas (e.g., SUMO) e o modo como estas modificações modulam a atividade de diferentes proteínas. O foco principal neste momento são as enzimas que garantem a transiência destas modificações, i.e., as desubiquitinases e as SUMO-proteases. Pretende-se identificar os substratos destas enzimas e estabelecer relações estrutura-função para estas proteases.

Publicações recentes:

- Pinto, M. P. et al. (2012) Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1823**, 1958–1966.

Grou, C. P. et al. (2012) Identification of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a deubiquitinase acting on ubiquitin-peroxin 5 (PEX5) thioester conjugate. *J. Biol. Chem.* **287**, 12815-12827.

Freitas, M. O. et al. (2011) PEX5 protein binds monomeric catalase blocking its tetramerization, and releases it upon binding the N-terminal domain of PEX14. *J Biol Chem.* **286**, 40509-40519.

Alencastre, I. S. et al. (2009) Mapping the cargo protein membrane translocation step into the PEX5 cycling pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 27243-27251. (Paper of the week; <http://www.jbc.org/content/284/40/e99951.full>).

Grou, C. P. et al. (2009) Properties of the ubiquitin-Pex5p thioester conjugate. *J. Biol. Chem.* **284**, 10504-10513.

Grou, C. P. et al. (2009) The peroxisomal protein import machinery – a case report of transient ubiquitination with a new flavor. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 254 – 262. (Review)

Grou, C. P. et al. (2008) Members of the E2D (UbcH5) family mediate the ubiquitination of the conserved cysteine of Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 14190-14197.

Estrutura Biomolecular

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/biomolecular-structure>

Contacto: Pedro Pereira (ppereira@ibmc.up.pt)

A pesquisa desenvolvida no Grupo de Estrutura Biomolecular (GEB) do IBMC centra-se na caracterização estrutural e funcional de proteínas, com ênfase particular em enzimas biomedicamente relevantes. Recorrendo à cristalografia de proteínas por difração de raios X como técnica central, complementada por uma variedade de outras abordagens bioquímicas, biofísicas e computacionais, o GEB tenta elucidar a função e forma de funcionamento de macromoléculas e complexos macromoleculares, a partir das suas estruturas experimentais.

As linhas de investigação atualmente em curso no GEB incluem a caracterização e validação de alvos terapêuticos potenciais de bactérias patogénicas, nomeadamente do género *Mycobacterium*, assim como a elucidação da forma de ação de moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro, com particular enfoque em anticoagulantes macromoleculares de parasitas hematófagos. Recorrendo a uma abordagem multidisciplinar, o GEB tem o fim último de contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, quer em doenças infecciosas, quer em patologias da coagulação.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

1. Caracterização estrutural e funcional de enzimas participantes em vias biossintéticas da parede micobacteriana, tendo em vista a determinação do seu mecanismo catalítico e a identificação de inibidores destas vias essenciais, que possam ser usados com fins terapêuticos.
2. Caracterização estrutural e bioquímica de inibidores de trombina identificados em animais hematófagos, visando a compreensão dos mecanismos moleculares de reconhecimento e inibição deste factor de coagulação e o desenvolvimento de antitrombóticos seguros e eficazes.

Publicações recentes:

Pereira *et al.* (2008) *Mycobacterium tuberculosis* glucosyl-3-phosphoglycerate synthase: structure of a key enzyme in methylglucose lipopolysaccharide biosynthesis. *PLoS ONE* **3**, e3748.

Empadinhas *et al.* (2011) Functional and structural characterization of a novel mannosyl-3-phosphoglycerate synthase from *Rubrobacter xylanophilus* reveals its dual substrate specificity. *Molecular Microbiology* **79**, 76-93.

Figueiredo *et al.* (2012) Rational Design and Characterization of D-Phe-Pro-D-Arg-Derived Direct Thrombin Inhibitors. *PLoS ONE* **7**, e34354.

Figueiredo *et al.* (2012) Unique thrombin inhibition mechanism by anophelin, an anticoagulant from the malaria vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **109**, E3649-E3658.

Unidade temática de Neurociências

Genética da Disfunção Cognitiva

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/genetics-cognitive-dysfunction>

Contacto: Isabel Silveira (isilveir@ibmc.up.pt)

O grupo Genética da Disfunção Cognitiva tem como objectivo identificar genes envolvidos neste grupo de patologias, bem como os mecanismos moleculares e celulares que conduzem a estas doenças, para futuro desenvolvimento de terapias.

Nós estudamos genes envolvidos na função e disfunção do cérebro. Muitas doenças do cérebro resultam da expansão de repetições geneticamente instáveis localizadas em regiões codificantes ou não codificantes do genoma. Estas doenças englobam uma grande variedade de doenças genéticas, tais como a forma mais comum de défice intelectual, o síndrome de X-Frágil, e muitas outras doenças com défice cognitivo. Os nossos resultados recentes são importantes não só no diagnóstico de famílias e doentes, mas também na neurobiologia e biologia celular. A aplicação de tecnologia genómica massiva tem contribuído muito para os resultados alcançados, na identificação de genes de doenças do cérebro.

Para além das abordagens de identificação de genes implicados em doenças do cérebro, nós estudamos a forma como as mutações genéticas exercem o seu efeito, através da identificação da cascata patológica do gene até à doença. O estudo de um murganho heterozigótico para a mutação *leaner* no gene *Cacna1a*, que codifica a subunidade $\alpha 1A$ de um canal de cálcio tipo P/Q, resultou na descoberta de défices motores e cognitivos dependentes da idade neste animal. Em colaboração com o grupo de Ciências de Animais de Laboratório, descobrimos que a estimulação física e comportamental atenuava os défices cognitivos nestes animais.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Título: Comportamento e neurotransmissão numa doença de um canal de cálcio neuronal

Este é um projecto extenso com 3 grandes objectivos (1) a) desenvolver baterias de testes de memória e aprendizagem adequados a animais com doenças neurodegenerativas com comprometimento motor e b) utilizar estes testes para estudar um murganho, obtido recentemente, com uma canalopatia autossómica dominante causada por uma mutação no gene *Cacna1a*; e investigar neste modelo alterações (2) na actividade neuronal e (3) na neurotransmissão. Os resultados vão permitir compreender o mecanismo patogénico nestas doenças neurodegenerativas, para desenvolvimento futuro de tratamentos que bloqueiem ou atrasem a progressão da doença.

Métodos: genética molecular, microscopia fluorescência e confocal, histopatologia básica, imunohistoquímica, cultura de células, baterias de testes de memória e aprendizagem em murganhos.

Ciências de Animais de Laboratório

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/laboratory-animal-science>

Contacto: Anna Olsson (Olsson@ibmc.up.pt) e Luís Antunes (lantunes@utad.pt)

Este grupo trabalha no sentido de melhorar a investigação assente na experimentação em animais, de modo a melhorar quer o bem-estar animal, quer a validade científica desses estudos. Em **estudos de comportamento e bem-estar animal**, o nosso principal interesse atualmente é compreender quais os principais factores na criação de murganhos que levam à mortalidade das crias, usando métodos experimentais e epidemiológicos. Na nossa linha de **investigação em anestesiologia** procuramos avaliar como diferentes anestésicos e concentrações podem afetar a fisiologia, a aprendizagem, a memória e a morfologia do cérebro em ratos e murganhos, no sentido de desenvolver protocolos anestésicos mais seguros e refinados. A informação obtida tem aplicação direta noutras espécies e trabalhamos através de uma rede que engloba laboratórios de ciência básica e hospitais humanos e veterinários. Na **investigação em ética**, interrogamo-nos sobre como podemos melhorar o balanço custo-benefício da experimentação em animais, englobando a identificação de aspetos críticos onde se pode melhorar o bem-estar animal, bem como diferentes maneiras de avaliar benefício.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

Título: Refinamento de anestesia

A anestesia visa proporcionar a ausência da dor e stress aos animais em procedimentos médicos ou cirúrgicos. Em investigação usando animais anestesia é frequentemente utilizada sem que os riscos associados estejam devidamente quantificados. O projeto visa avaliar como diferentes combinações de anestésicos e concentrações podem afetar a fisiologia, a aprendizagem, a memória e a morfofisiologia do cérebro em ratos e ratinhos. Desta forma é possível desenvolver protocolos anestésicos mais seguros e refinados. Tendo a informação obtida aplicação direta noutras espécies, trabalhamos através de uma rede de laboratórios de investigação em bioquímica, histologia e farmacologia e hospitais humanos e veterinários.

Métodos: modelos farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD), estudos fisiológicos, toxicologia e (histo)patologia básicas

Título: Mortalidade precoce de crias de murganhos de laboratório

A perda de ninhadas inteiras durante os primeiros dias após o parto é um problema na criação de murganhos em laboratório, sendo os factores subjacentes ainda pouco conhecidos. Este projecto, realizado em colaboração com um biotério de investigação, tem por objectivo identificar factores de risco através de uma abordagem epidemiológica, e usar estudos em patologia e comportamento para compreender como, e em que situações, esta mortalidade pode ocorrer.

Métodos: Epidemiologia, estudos comportamentais, (histo)patologia básica

Título: Ética de experimentação animal

Os animais têm desempenhado e continuam a ter um papel significativo em investigação em ciências de vida e saúde. A experimentação animal é, contudo, controversa, sendo que apresenta um dilema entre dano (causado aos animais) e benefício (colhido pelos seres humanos). Nesta linha de investigação exploraremos diferentes questões associadas a este dilema, como a integração de animais de companhia na investigação científica, métodos de avaliar balanço dano-benefício e atitudes, conhecimento e implementação dos 3Rs.

Métodos: Análise Ética, entrevistas, revisão bibliográfica e legislação

Ageing and Stress

<http://www.ibmc.up.pt/research/research-groups/ageing-and-stress>

Contacto: Henrique Almeida (almeidah@med.up.pt)

O grupo «**Ageing and Stress**» é composto por 5 doutorados (incluindo 2 MDs e um estudante pós-doc), 6 estudantes de doutoramento e 5 estudantes de Mestrado. Sendo grupo do IBMC, o seu laboratório localiza-se nas novas instalações da Faculdade de Medicina do Porto.

Dentro dos interesses do grupo, em acordo a sua designação e temas das publicações, realçam-se os fundamentos biológicos da involução funcional (envelhecimento) com destaque para os efeitos do stress oxidativo sobre proteínas e o seu envolvimento na senescência celular. Num componente de envelhecimento reprodutivo, incluem-se os efeitos da idade e dietas no corpo cavernoso humano e murino e na performance funcional de células do cumulus oophorus humano e do leito placentar. O sistema das melanocortinas, inicialmente componente do stress do organismo, revelou-se um regulador importante da lipólise e continua parte integrante dos interesses do grupo.

Temas de trabalho disponíveis para doutoramento ou pós-doutoramento

1. Pós-doutoramento: A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública em países desenvolvidos. Um mecanismo diretamente relacionado com a regulação da homeostasia energética é o que inclui o sistema das melanocortinas. Ele actua ao nível do sistema nervoso central e possui um efeito anorexigénico, ilustrado pelo fenótipo de obesidade observado em indivíduos com alterações nesse sistema. Adicionalmente, tem acção numa variedade de tecidos periféricos, incluindo o adiposo, principalmente em situações de stress fisiológico. *Empregando modelos celulares de origem humana, pretende-se identificar vias metabólicas e de sinalização diretamente reguladas pelas melanocortinas, informação essencial para o desenvolvimento de terapias anti-obesidade.*

2. Doutoramento: Havendo evidência de que a ingestão regular de antioxidantes polifenólicos do tipo flavonóide, exemplificados pelas catequinas em que o chá verde é naturalmente rico, tem efeitos benéficos na saúde e contribui para um envelhecimento saudável, não há clareza relativamente aos mecanismos moleculares envolvidos. Por outro lado, há evidência crescente de que a dieta influencia fortemente as características epigenéticas de células nos organismos, alterando desta forma a expressão genética, sem modificar a sequência de nucleotídeos no DNA. *Usando um modelo murino sob dieta hiperlipídica e em restrição calórica, propõe-se o estudo de modificações epigenéticas induzidas pelo consumo de chá verde no sistema cardiovascular do Rato adulto. Serão objecto modificações em histonas, a metilação do DNA e a atividade de sirtuinas após consumo precoce e prolongado de chá verde e preparados de catequinas.*

Seleção de trabalhos recentes:

Tomada et al., (2013) Androgen depletion in humans leads to cavernous tissue reorganization and upregulation of Sirt1-eNOS axis. *AGE* 35 (1): 35-47

Rodrigues et al., (2013) α -MSH signalling via melanocortin 5 receptor promotes lipolysis and impairs re-esterification in adipocytes. *BBActa*, aceite.

Tomada et al., (2012) Energy restriction and exercise modulate Angiopoietins and Vascular Endothelial Growth Factor expression in the cavernous tissue of high-fat diet-fed rats. *Asian J Androl.* 14: 635–642

Matos et al., (2012) Copper ability to induce premature senescence in human fibroblasts. *AGE*, 34:783–794.

Castro et al. (2012) Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free Rad Biol & Med.* 53(4): 916-25.

Rodrigues et al. (2012) Melanocortin 5 receptor signaling and internalization: Role of MAPK/ERK pathway and β -arrestins. 1/2. *Mol Cell Endocrin* 361 (2012) 69–79.

Figueiredo et al. (2011) Real-time PCR study of Ang1, Ang2, Tie-2, VEGF and KDR expression in human erectile tissue during aging. *J Sex Med.* 8:1341-1351.